



TITLE:

NMR studies of phospholipids and liposomal membranes(Abstract_要旨)

AUTHOR(S):

周, 哲

CITATION:

周, 哲. NMR studies of phospholipids and liposomal membranes. 京都大学, 1997, 博士(工学)

ISSUE DATE:

1997-03-24

URL:

<http://hdl.handle.net/2433/202364>

RIGHT:

氏 名	シュウ 周 哲
学位(専攻分野)	博 士 (工 学)
学 位 記 番 号	論 工 博 第 3243 号
学位授与の日付	平 成 9 年 3 月 24 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 2 項 該 当
学位論文題目	NMR studies of phospholipids and liposomal membranes (核磁気共鳴法によるリン脂質およびリポソーム膜の研究)

	(主 査)			
論文調査委員	教 授 砂 本 順 三	教 授 生 越 久 靖	教 授 森 島 績	

論 文 内 容 の 要 旨

本論文では、人工的に形成された脂質 2 分子膜小胞 (リポソーム) 膜中におけるリン脂質分子の挙動およびイオンの脂質 2 分子膜透過に関して、核磁気共鳴 (NMR) 法を利用しておこなった研究成果について 5 章にわたり記述している。天然に存在するリン脂質であるホスファチジルコリン (PC) はその構造中に長鎖脂肪酸のグリセロールエステル結合を持つ。第 1 章および第 2 章においては、このエステル結合をアミド結合にて置き換えた構造を持ち、人工境界脂質となりうる非天然型のリン脂質、1,2-ジミリスタミド-1,2-デオキシホスファチジルコリン ($D_{14}DPC$) が、リポソーム膜内において示す挙動の解明をおこなっている。また第 3 章以降においては、リポソーム脂質 2 分子膜の内外に存在するイオン種を NMR により区別して観測するという方法論に基づき、種々の陽イオンおよび陰イオン種の脂質 2 分子膜透過に関して検討をおこなっている。これらの研究成果は以下のとおり要約することができる。

第 1 章ではリポソーム膜中における脂質分子の分布および運動性に関する NMR を利用した研究について述べている。 1H -NMR における核オーバーハウザー効果 - 交換分光法 (NOESY) および核オーバーハウザー効果差分光法 (NOEDF) により 1,2-ジミリストイルホスファチジルコリン (DMPC) と $D_{14}DPC$ との間でコリンのメチル基のケミカルシフトが異なること、さらに $D_{14}DPC/DMPC$ 混合リポソーム中では、 $D_{14}DPC$ は脂質 2 分子膜外層に偏在していることを明らかにした。また 1H 検出 ^{13}C -NMR 法をリポソーム膜系の測定に初めて適用し、この測定法の利用により、従来よりも高感度の測定が可能となることを示した。

第 2 章では ^{31}P -NMR を用いて脂質 2 分子膜中における脂質分子の立体構造および運動性に関して検討をおこなっている。ここでは $D_{14}DPC$ 単独から形成されたリポソーム膜中では $D_{14}DPC$ 分子の極性頭部の立体構造および運動性が、DMPC とは異なることを明らかとし、これが分子内水素結合に起因している可能性を指摘した。さらに $D_{14}DPC/DMPC$ 混合リポソーム膜中では $D_{14}DPC$ 分子の極性頭部のコンフォメーションおよび運動性は DMPC とほぼ同じであり、この混合膜中では両脂質分子間の水素結合の寄与は小さいと考えられることを示した。

第3章では陽イオンのリポソーム膜透過のNMRによる観測に関して述べている。ここではまず抗生物質である septamycin が Na^+ , K^+ および Cs^+ イオンのリポソーム脂質 2 分子膜透過を促進するイオノフォアとして機能することを初めて明らかにした。さらに ^{23}Na -NMR を利用して Na^+ イオンの輸送速度を決定し, septamycin の膜表面における Na イオン結合定数は他のイオノフォリックな抗生物質と比較して著しく低いことを示した。またさらにリポソーム膜透過による Na^+ イオンと Cs^+ イオンとの交換速度を決定した。

第4章ではハライド陰イオンのNMRによる観測およびそのリポソーム膜透過に関して述べている。まず Mn^{2+} が極めて効率の良いNMR緩和試薬であることを見出した。そして Mn^{2+} を緩和試薬として用いることにより, 従来不可能であったリポソーム膜内水相に存在する $^{35}\text{Cl}^-$ もしくは $^{81}\text{Br}^-$ と外水相に存在するこれらのイオンとの区別を初めて可能とし, これらのアニオンの膜透過の測定をおこなった。実際にテトラブチルアンモニウムイオンもしくはベンジルトリブチルアンモニウムイオン相間移動触媒による, あるいはバリノマイシン-アンモニウムイオンコンプレックスとのイオンペア形成によるハライドイオンの輸送を観測した。

第5章では実細胞内に存在する Cl^- イオンのNMRによる観測に関して述べている。 Cl^- イオンは通常の哺乳類細胞中に最も高濃度で存在する陰イオン種であるが, これまでこの細胞内 Cl^- イオンはNMRにおいては観測不能と考えられていた。ここでは第4章において開発した手法に基づいて ^{35}Cl -NMRにおけるコントラスト試薬として Mn^{2+} を利用することにより, 赤血球内の Cl^- イオンに由来するNMRピークを初めて観測することに成功した。さらにスピン-スピン緩和時間を求めた。

論文審査の結果の要旨

本論文では, 核磁気共鳴 (NMR) 法によるリポソーム膜中のリン脂質の挙動およびイオンの膜透過に関する研究結果を5章にわたり述べている。第1章および第2章では, 天然型ホスファチジルコリン (PC) の持つエステル結合に代えてアミド結合を持ち, 人工境界脂質となりうる非天然型リン脂質, 1,2-ジミリスタミド-1,2-デオキシホスファチジルコリン (D_{14}DPC) の, リポソーム膜内挙動を解明している。また第3章以降では, 脂質 2 分子膜の内外に存在するイオン種をNMRにより区別し, その膜透過を検討している。これらの研究成果は以下に要約される。

- (1) $\text{D}_{14}\text{DPC}/\text{DMPC}$ 混合リポソーム脂質 2 分子膜中では, 外層へ DMPC よりも D_{14}DPC が偏在することを明らかにした。この際 ^1H 検出 ^{13}C -NMR 法の適用により, 従来法よりも高感度の測定を可能にした。
- (2) D_{14}DPC 分子の極性頭部の立体構造および運動性は, D_{14}DPC 単独から形成したリポソーム膜中では DMPC とは異なるが, $\text{D}_{14}\text{DPC}/\text{DMPC}$ 混合リポソーム膜中では DMPC とほぼ同じであり, 混合膜中においては両脂質分子間の水素結合の寄与は小さいことを示した。
- (3) 抗生物質 septamycin が Na^+ , K^+ および Cs^+ イオンの膜透過を促進するイオノフォアとして機能することを初めて明らかにした。
- (4) 緩和試薬として Mn^{2+} を用い, 従来不可能であったリポソーム膜内外の $^{35}\text{Cl}^-$ あるいは $^{81}\text{Br}^-$ の

識別および膜透過の観測を可能とした。さらにこの手法により赤血球内外の Cl^- イオンの区別をも初めて可能にした。

以上、本論文では D_{14}DPC の膜内挙動の詳細を NMR 法により解明し、 ^1H 検出 ^{13}C -NMR 法による脂質分子の挙動解明の可能性を開いた。また主要な生命現象であるイオンの膜透過の研究への NMR 法のさらなる利用の可能性を示した。これらはいずれも学術的にも実際的にも極めて意義のある成果であり、依って本論文は博士（工学）の学位論文として価値あるものと認めた。また、平成 9 年 2 月 21 日、論文内容とそれに関連した事項に関して試問をおこない、その結果、合格と認めた。